厌氧真菌及其植物细胞壁降解酶应用研究进展

王砀砀　赵聪聪　蔡传江　姚军虎　曹阳春¯

（西北农林科技大学动物科技学院，杨凌 712100）

摘　要：厌氧真菌具有很强的植物组织降解能力，其强大的假根系统和分泌的一系列植物细胞壁降解酶能够将生物质资源高效的降解为易于利用且附加值高的化合物。这对解决饲料短缺、能源危机和环境问题具有重要的现实意义。本文在相关研究的基础上，概述厌氧真菌的分类地位、研究方法及应用研究，为厌氧真菌及其分泌的植物细胞壁降解酶进一步研究及科学应用提供参考。

关键词：厌氧真菌；植物细胞壁降解酶；生物质资源；应用研究

中图分类号：S852.2

厌氧真菌是草食动物消化道内一类重要降解植物细胞壁的功能菌，在植物纤维组织消化中起着重要作用。它不仅能够利用假根生长穿透植物细胞壁的角质层和木质素，同时能够产生降解植物细胞壁的高活性纤维素酶、半纤维素酶、酯酶和纤维小体等[1-2]。厌氧真菌分泌的植物细胞壁降解酶活性高于目前市场上应用的菌株里氏木霉（*Trichoderma reesei*）和曲霉（*Aspergillus nidulans*）[3]，在生物能源、饲料工业、沼气发酵等领域具有广阔的应用前景。目前，高植物细胞壁降解酶活性厌氧真菌的筛选成为研究热点，同时利用厌氧真菌及其植物细胞壁降解酶来提高生物质资源的利用率具有重要的现实意义。因此，本文在相关研究的基础上，概述厌氧真菌的分类地位、研究方法及其植物细胞壁降解酶的应用价值。

1　厌氧真菌简介

由于长期对瘤胃厌氧真菌形态学和生理生化特征的认知比较欠缺，所以一直无法对厌氧真菌的生物学地位进行准确分类，厌氧真菌曾被错误认为是瘤胃原虫。直到 1975 年，英国科学家 Orpin 发现绵羊瘤胃中 *Neocallimastix frontalis* 等 3 类游动孢子的形态学特征和水生藻类真菌相似，而且其细胞壁含有真菌细胞壁所特有的几丁质，首次证实瘤胃中存在厌氧真菌[4-5]，随后将其归于真菌界鞭毛菌亚门壶菌纲（Chytridiomycetes）[6]。近年来大量的研究发现，厌氧真菌在多鞭毛游动孢子、超显微结构和氢化酶体等方面有着不同于其他壶菌的形态学和生理生化特征[7]。随着核糖体（nrDNA）（18S、5.8S 和 28S）系统发育分析的发展，厌氧真菌被重新划分为 Neocallimastigomycota（门），Neocallimastigomycetes（纲），Neocallimastigales（目）[8-9]。

经过 40 多年的研究，国内外学者已从草食动物消化道及粪样中分离获得 20 种以上的厌氧真菌（表 1）[10]。目前一般根据厌氧真菌游动孢子的鞭毛数、假根形态以及菌体特征等形

收稿日期：2017-09-04

基金项目：国家自然基金项目（31402102）；中国博士后科学基金（2015T81058，2014M552497）；青海省重点实验室专项（2013-Z-Y03）

作者简介：王砀砀（1990-），男，安徽宿州人，硕士研究生，从事反刍动物营养研究。E-mail：wangdang2015@126.com

¯通信作者：曹阳春，副教授，硕士生导师，E-mail： caoyangchun@126.com

态学特征将其分为 6 个属，分别为新丽鞭毛菌（*Neocallimastix*）、单鞭毛菌属（*Piromyces*）、厌氧真菌属（*Orpinomyces*）、厌氧鞭菌属（*Anaeromyces*）、盲肠鞭菌属（*Caecomyces*）、枝梗鞭菌属（*Cyllamyces*）[11-12]。

表 1 从草食动物分离获得的部分厌氧真菌

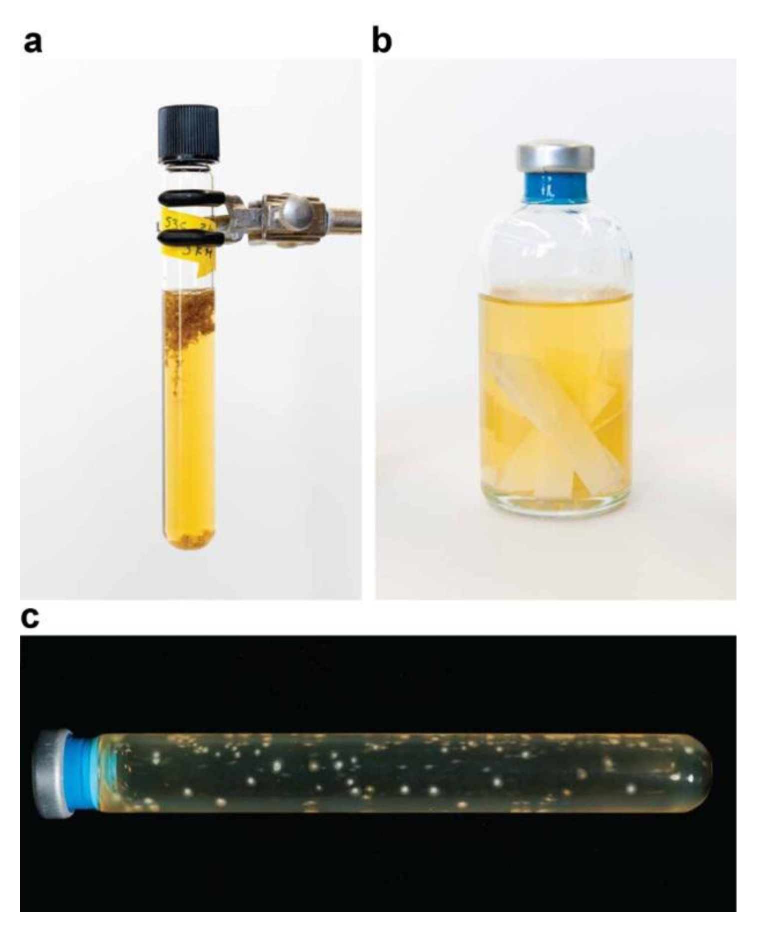
Table 1 Overview of anaerobic fungal isolates from ruminant and non-ruminant herbivores[10]

	形态学 Morphology			
种属 Genus	菌体 Thallus	游动孢子 Zoospores	菌株 Species	来源 Source
厌氧鞭菌属 *Anaeromyces*	多中心	单鞭毛	*Anaeromyces mucronatus*	奶牛
盲肠鞭菌属 *Caecomyces*	单中心	单鞭毛	*Caecomyces communis*	绵羊
			Caecomyces equi	马
			Caecomyces sympodialis	奶牛
枝梗鞭菌属 *Cyllamyces*	多中心	单鞭毛	*Cyllamyces aberensis*	奶牛
新丽鞭毛菌 *Neocallimastix*	单中心	多鞭毛	*Neocallimastix frontalis*	绵羊
			Neocallimastix patriarcum	绵羊
			Neocallimastix sp. YAK11	牦牛
			Neocallimastix sp. MC2	奶牛
			Neocallimastix sp. R1	绵羊
			Neocallimastix sp. YQ1	奶牛
			Neocallimastix sp. L2	美洲驼羊
厌氧真菌属 *Orpinomyces*	多中心	多鞭毛	*Orpinomyces* sp. C1A	奶牛
			Orpinomyces sp. PC2	奶牛
单鞭毛菌属 *Piromyces*	单中心	单鞭毛	*Piromyces equi*	马
			Piromyces sp. E2	大象
			Piromyces sp. R1	犀牛
			Piromyces communis	绵羊
			Piromyces sp. MC1	奶牛
			Piromyces rhizinflatus	水牛

2 厌氧真菌的研究方法

2.1 体外培养技术

目前，厌氧真菌的分离培养多采用亨盖特滚管技术。该技术是 Hungate 在 1950 年首次提出并应用于瘤胃厌氧细菌研究。其基本原理是将厌氧微生物接种到充满 CO_2 或 N_2 并装有已除氧培养基的密封亨氏管（图 1）中进行筛选培养[10]。该方法随后得到不断的改进完善，至今已成为研究严格、专性厌氧微生物的一种有效技术。



a.装有液体培养基的厌氧管；b.装有液体培养基和滤纸条的厌氧瓶；c.装有固体培养基的厌氧管。

a. Anaerobic tube with liquid culture medium; b. Anaerobic bottle with liquid culture medium and filter paper stripe; c. Anaerobic tube with solid culture medium.

图 1　Hungate 氏厌氧管

Fig.1　Hungate’s anaerobic tubes[10]

目前实验室使用较多的厌氧真菌培养基主要是以 **Hungate 氏**培养基[13]、M10 培养基[14]、Lowe 培养基[15]和 Orpin 培养基[16]为基础，根据各自研究目的对培养基进行一定的改良。这些培养基通常含有磷酸盐缓冲液、无细胞瘤胃液、*L*-半胱氨酸盐酸和刃天青指示剂等成分，不仅为厌氧真菌的生长提供稳定的 pH（6.5~6.7）环境、丰富的营养物质，还能够检测并去除培养基中剩余的氧气。

2.2　分类鉴定

由于不同种属厌氧真菌具有不同的形态学特征（表 2）[8]，在普通光学显微镜和扫描电子显微镜下可根据丝状假根（*Neocallimastix*、*Piromyces*、*Orpinomyces*、*Anaeromyces*）或球状假根（*Caecomyces*、*Cyllamyces*），游动孢子鞭毛数量等特征对厌氧真菌进行初步的形态学种属鉴定。此外，应用 DNA 荧光染料对厌氧真菌细胞核进行染色，在荧光显微镜下观察厌氧真菌细胞核分布情况，进而根据单中心类型（*Neocallimastix*、*Piromyces*、*Caecomyces*）或多中心类型（*Orpinomyces*、*Anaeromyces*、*Cyllamyces*）对菌株进行进一步分类鉴定。

表 2　不同种属厌氧真菌的形态学特征

Table 2 Morphological classification of different anaerobic fungal genera[8]

种属 Genus	菌体 Thallus	假根 Rhizoids	游动孢子鞭毛数 Flagella per zoospore
新丽鞭毛菌 *Neocallimastix*	单中心	丝状假根	多鞭毛
单鞭毛菌属 *Piromyces*	单中心	丝状假根	单鞭毛，偶见双鞭毛或四鞭毛
盲肠鞭菌属 *Caecomyces*	单中心	球状假根	单鞭毛，偶见双鞭毛或四鞭毛
厌氧真菌属 *Orpinomyces*	多中心	丝状假根	多鞭毛
厌氧鞭菌属 *Anaeromyces*	多中心	丝状假根	单鞭毛
枝梗鞭菌属 *Cyllamyces*	多中心	球状假根	单鞭毛，偶见双鞭毛或四鞭毛

但由于培养基成分、培养条件及传代次数等因素会对厌氧真菌的形态结构产生显著的影响，而且目前实验室条件下难以对游动孢子释放、孢子囊的生长等动态变化进行观察[11-12]。因此，厌氧真菌的分类鉴定需要形态学观察结合分子生物学手段进行。目前已应用于厌氧真菌鉴定的分子生物学技术主要有 18S rDNA 基因序列分析技术、核糖体内转录间隔区（ITS）序列分析技术和核糖体大亚基 DNA（nrDNA-LSU）序列分析技术。但由于厌氧真菌 18S rDNA 序列高度保守（相似性>97%），不能有效地分析厌氧真菌之间的关系[17]。与 18S rDNA 相比，厌氧真菌的 ITS 序列在进化过程中相对稳定而又相对变化，其位于 nrDNA 上的高度可变异区，能够显示真菌属间和属内的遗传变异，目前 ITS1 和 ITS2 序列已成为厌氧真菌分子鉴定、系统发育和遗传多样性分析的重要分子标记[18]。nrDNA-LSU 序列也是位于 nrDNA 上的高变区，能够反映一个属、亲缘关系较近的种或一个种及其种群之间的进化关系[19]。越来越多的研究以 28S rDNA 作为厌氧真菌分子鉴定和系统发育分析的 DNA 片段[20-21]。Tan 等[22]研究发现结合 18S rDNA、28S rDNA D1/D2 区和 ITS 序列能够更准确的对厌氧真菌进行种属鉴定。

3 厌氧真菌及其植物细胞壁降解酶的应用研究

厌氧真菌具有很强的降解不同植物细胞壁的能力，在农业生物质资源利用中发挥重要的作用。厌氧真菌通过其丰富的假根系统侵袭难以被降解的纤维组织，破坏植物细胞壁结构并使其变得疏松，从而易于被其他微生物和水解酶降解。同时，厌氧真菌分泌高活性的纤维素酶（内切葡聚糖酶、外切葡聚糖酶和β-葡萄糖苷酶）、半纤维素酶（木聚糖酶）、酯酶（阿魏酸酯酶、乙酰酯酶和 *p*-香豆酸酯酶）、漆酶和纤维小体等[1-2]，协同分解利用结构复杂的纤维素、半纤维素和果胶等物质。在厌氧真菌及其降解酶的共同作用下植物细胞壁高效地分解为葡萄糖、木糖等可溶性糖，使其在饲料工业、生物能源等领域的应用成为可能。

厌氧真菌利用不同碳源作为底物进行混合酸发酵，代谢产物主要为甲酸、乙酸、乳酸、乙醇、H_2 和 CO_2 等[23-25]。甲烷菌能够利用厌氧真菌的代谢产物，同时消除代谢产物对厌氧真菌生长繁殖的反馈抑制作用，促进真菌 ATP 产生，进而提高酶的活性和产量[26-27]。厌氧真菌与甲烷菌共培养显著提高其对纤维素等底物的降解能力，同时产生大量甲烷和乙酸等发酵终产物[27-29]，这为厌氧真菌在沼气发酵工程中的应用提供了理论依据。

3.1 在饲料工业和养殖业中的应用

秸秆类粗饲料含有大量难以被降解且结构复杂的植物性多糖，单胃动物一般无法利用，反刍动物的消化率也仅有 20%~30%[30]。而纤维素酶、半纤维素酶等植物细胞壁降解酶能够破坏植物细胞壁，将难以降解的多糖水解成易于被动物利用的单糖，同时消除木质素、纤维素和木聚糖的抗营养作用，从而改善秸秆类饲料的营养品质，提高粗饲料的利用率。Cao 等[31]以燕麦秸秆、玉米秸秆、水稻秸秆和小麦秸秆为饲料底物，连续 10 d 纯培养牦牛瘤胃真菌 *Neocallimastix* sp. YAK11，发现牦牛真菌生长在富含纤维素的饲料细胞壁底物上能够分泌高活性的纤维素酶，并可促进对农作物秸秆的降解。Paul 等[32]以小麦秸秆为底物进行体外发酵试验，发现野牛厌氧真菌和瘤胃微生物混合发酵 24 h 后可增加小麦秸秆的体外降解率。Nagpal 等[33]从大象、山羊、绵羊等草食动物肠道内筛选获得的厌氧真菌表现出较高的木聚糖酶、羧甲基纤维素酶、纤维二糖酶和滤纸纤维素酶活性，同时体外发酵试验表明厌氧真菌能够提高饲料的干物质消化率。厌氧真菌能够高效的降解玉米秸秆、小麦秸秆等农业生物质资源，使得厌氧真菌及其植物细胞壁降解酶在缓解我国养殖业饲料短缺和提高动物粗饲料利用等方面具有广泛的应用前景。

同时，厌氧真菌直接作为添加剂也得到越来越多的应用。Thareja 等[34]以小麦秸秆为底物的体外发酵试验表明，瘤胃厌氧真菌能够提高小麦秸秆干物质和中性洗涤纤维（NDF）的体外降解率。稻草黄贮时添加纯培养瘤胃真菌能够降低黄贮饲料 NDF 和酸性洗涤纤维（ADF）含量，提高黄贮饲料粗纤维的降解率[35]。王砀砀[36]在全株玉米青贮中接种厌氧真菌 *Piromyces* sp. CN6，结果表明瘤胃真菌能够改善青贮饲料的发酵品质和营养成分，提高粗纤维的降解率。另外，在高粗料饲粮条件下，直接灌服瘤胃真菌能够提高育肥牛日增重、泌乳牛产奶量，同时能够提高瘤胃内挥发性脂肪酸浓度、游动孢子数量和饲料利用率[37-39]。

相较于常用的纤维素酶菌株，肠道真菌分泌的细胞壁降解酶活性高，酶系更完整，同时具有良好的酸碱稳定性和热稳定性。王砀砀等[40]研究发现，瘤胃厌氧真菌 *Piromyces* sp. CN6 分泌的木聚糖酶最适反应温度为 50 ℃，最适 pH 为 5.0，该酶在 40 ℃和 pH 5.0~8.0 下较稳定；乙酰酯酶的最适反应温度为 50 ℃，最适 pH 为 9.0，该酶在 40 ℃和 pH 5.0~10.0 下较稳定。Chen 等[41]研究发现瘤胃真菌木聚糖酶在 pH 3.0~11.0 范围内具有较高的活性，表现出较好的工业应用前景。曹阳春[42]研究发现 *Neocallimastix* sp. YAK11 分泌的阿魏酸酯酶活性在 pH 4.0~9.0 范围内都比较稳定，乙酰酯酶活性在 pH 5.0~10.0 范围内都比较稳定。而且粗酶液在 50 ℃的水浴锅中保温 24 h 后，阿魏酸酯酶活性仍能剩余 53%。厌氧真菌分泌的植物细胞壁降解酶具有较高的活性，其中部分水解酶的最适反应条件与动物消化道生理条件较接近，而且在较宽的温度和 pH 范围内均具有较高的活性，同时具有良好的热稳定性和酸碱稳定性，便于饲料制粒和储存，具有广阔的饲料工业生产潜力。

目前，主要是通过在饲料中添加纤维素酶、半纤维素酶等细胞壁降解酶来提高动物纤维饲料的消化率。真菌降解纤维试验存在效果不稳定，可重复性差，菌种差异性较大，真菌连续培养成本高、不可持续等问题。未来可通过利用厌氧真菌基因资源构建高效工程菌，优化

培养和产酶条件达到工业生产的目的，使厌氧真菌降解酶基因资源以益生菌或酶制剂的形式大规模应用于饲料工业领域。

3.2　在生物能源领域中的应用

生物质资源是自然界广泛存在的可再生、低成本、来源丰富的天然能源。利用生物质资源生产燃料乙醇成为可持续能源发展研究领域的热点。然而，生物质资源利用率低、生产成本高、发酵液中乙醇浓度低等问题限制生物能源的持续发展。Ranganathan 等[43]研究发现，利用厌氧真菌 *Orpinomyces* C1A 及其分泌的植物细胞壁降解酶能够将预处理后的木质纤维素生物质更直接、更有效的转化为可溶性糖和生物燃料。该试验分为真菌定殖、多糖水解、微生物发酵等阶段，首先厌氧真菌利用生物质大量繁殖，并借助假根的生长破坏植物细胞壁表层，同时分泌降解植物细胞壁的纤维素酶、半纤维素酶和酯酶等。然后发酵罐中注入空气或者添加环己酰亚胺抑制真菌的繁殖和生长，植物细胞壁降解酶继续将生物质转成葡萄糖和木糖，该阶段发酵罐积累大量的可溶性糖。随后利用重组大肠杆菌 K011 将发酵罐中的可溶性糖转化成乙醇等生物燃料。厌氧真菌利用强大的假根系统和分泌的高活性植物细胞壁降解酶将木质纤维素高效的降解成可溶性糖，进而被重组大肠杆菌 K011 转化为乙醇等生物燃料。本试验最终高达 14.1%的玉米秸秆被转化为乙醇。

相比于工业生产技术，利用厌氧真菌进行乙醇生产时，其优点是不用额外添加细胞壁降解酶，成本较低。而部分生物质被用于真菌自身的生长、繁殖和产酶等，生物质资源转化为乙醇的效率较低。但是，此法效率显著高于 Chung 等[44]利用 *Caldicellulosiruptor bescii* strain JWCB033、Jin 等[45]*Clostridium phytofermentans* ATCC700394、Minty 等[46]利用里氏木霉 RUTC30 和大肠杆菌 NV3 pSA55/69 共培养等利用微生物生产燃料乙醇。

另外，真菌定殖阶段需要严格控制厌氧环境和培养条件，这也在一定程度上限制了其工业化生产。未来可通过严格控制发酵罐无氧环境、优化生物质前处理方法、改变微生物添加量、补充限制性降解酶等技术获取更高的可溶性糖产量，并通过应用高效微生物（利用可溶性糖生成乙醇）或多种微生物协同作用获取更多的燃料乙醇，从而提高生物质转化效率。

3.3　在沼气发酵工程中的应用

沼气发酵是厌氧微生物在厌氧条件下将秸秆和粪便等有机质转化成沼气的一种发酵方式，是利用生物质能源的有效途径。但秸秆类生物质富含纤维素和半纤维素等难以被降解的成分，成为沼气发酵的限速因素。研究发现利用秸秆进行沼气发酵时添加厌氧真菌可以改善发酵品质，提高生物质降解率和沼气产量[47-49]。厌氧真菌应用在沼气发酵时能够促进秸秆类生物质的水解，提高发酵过程中甲烷菌的数量，加速秸秆的降解，进而增加沼气的产量。因此，厌氧真菌在沼气发酵工程领域具有广阔的应用前景。

4　小　结

由于厌氧真菌具有严格厌氧的特性，因此在保存、运输和应用过程中需要严格控制无氧环境，同时厌氧真菌对培养条件（pH、温度等）要求严格，这对厌氧真菌的大规模应用提出了较大的挑战。未来应进一步研究完善厌氧真菌保存方法，使其在保存、运输等过程中保

持较高的活性。同时，继续从长期饲喂高粗饲料反刍动物（牦牛、水牛等）瘤胃中筛选获得高细胞壁降解酶活性厌氧真菌，挖掘酶基因，构建高效工程菌并优化培养和产酶条件，以便进行大规模的植物细胞壁降解酶的工业化生产与应用。

厌氧真菌具有微生物发酵的优势和特点，其发酵速度快，分泌的细胞壁降解酶活性高、种类丰富，降解酶之间具有高效协同作用。高活性植物细胞壁降解酶作为添加剂在饲料工业、制浆造纸、食品工业等领域的应用具有广阔的前景。同时，实验室的理论研究已证明厌氧真菌及其植物细胞壁降解酶可提高生物质资源的利用率，以及利用廉价的木质纤维素底物生产高活性木聚糖酶、酯酶、甲烷、燃料乙醇和乙酸等。因此，厌氧真菌可直接、大规模应用于生物能源和沼气发酵等厌氧发酵领域，并具有广阔的工业发展前景和重大的社会意义。

随着全球范围内的人口、能源、环境问题的加剧，对生物质资源的有效开发和利用已成为共识的趋势和热点，而利用厌氧真菌及其植物细胞壁降解酶将生物质资源绿色高效的转化为具有高附加值的化合物是解决上述问题的重要途径，对社会和经济具有推动作用。

参考文献：

[1] BRUNECKY R,ALAHUHTA M,XU Q,et al.Revealing nature's cellulase diversity:the digestion mechanism of *Caldicellulosiruptor bescii* CelA[J].Science,2013,342(6165):1513–1516.

[2] WANG T Y,CHEN H L,LU M Y J,et al.Functional characterization of cellulases identified from the cow rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* W5 by transcriptomic and secretomic analyses[J].Biotechnology for Biofuels,2011,4:24.

[3] SOLOMON K V,HAITJEMA C H,HENSKE J K,et al.Early-branching gut fungi possess a large,comprehensive array of biomass-degrading enzymes[J].Science,2016,351(6278):1192–1195.

[4] ORPIN C G.Studies on the rumen flagellate *Neocallimastix frontalis*[J].Microbiology,1975,91(2):249–262.

[5] ORPIN C G.The occurrence of chitin in the cell walls of the rumen organisms *Neocallimastix frontalis*,*Piromonas communis* and *Sphaeromonas communis*[J].Microbiology,1977,99(1):215–218.

[6] BARR D J S.An outline for the reclassification of the Chytridiales,and for a new order,the Spizellomycetales[J].Canadian Journal of Botany,1980,58(22):2380–2394.

[7] FLIEGEROVÁ K,HODROVÁ B,VOIGT K.Classical and molecular approaches as a powerful tool for the characterization of rumen polycentric fungi[J].Folia Microbiologica,2004,49(2):157–164.

[8] GRUNINGER R J,PUNIYA A K,CALLAGHAN T M,et al.Anaerobic fungi (phylum *Neocallimastigomycota*):advances in understanding their taxonomy,life cycle,ecology,role and biotechnological potential[J].FEMS Microbiology Ecology,2014,90(1):1–17.

[9] HIBBETT D S,BINDER M,BISCHOFF J F,et al.A higher-level phylogenetic classification of the Fungi[J].Mycological Research,2007,111(5):509–547.

[10] HAITJEMA C H,SOLOMON K V,HENSKE J K,et al.Anaerobic gut fungi:advances in isolation,culture,and cellulolytic enzyme discovery for biofuel production[J].Biotechnology and Bioengineering,2014,111(8):1471–1482.

[11] HO Y W,BARR D J S.Classification of anaerobic gut fungi from herbivores with emphasis on rumen fungi from Malaysia[J].Mycologia,1995,87(5):655–677.

[12] OZKOSE E,THOMAS B J,DAVIES D R,et al.*Cyllamyces aberensis* gen.nov.sp.nov.,a new

anaerobic gut fungus with branched sporangiophores isolated from cattle[J].Canadian Journal of Botany,2001,79(6):666–673.
[13] HUNGATE R E.A roll tube method for cultivation of strict anaerobes[J].Methods in Microbiology,1969,3:117–132.
[14] CALDWELL D R,BRYANT M P.Medium without rumen fluid for nonselective enumeration and isolation of rumen bacteria[J].Applied Microbiology,1966,14(5):794–801.
[15] LOWE S E,THEODOROU M K,TRINCI A P J,et al.Growth of anaerobic rumen fungi on defined and semi-defined media lacking rumen fluid[J].Microbiology,1985,131(9):2225–2229.
[16] Orpin C G.Studies on the rumen flagellate *Sphaeromonas communis*[J].Microbiology,1976,94(2):270–280.
[17] DORE J,STAHL D A.Phylogeny of anaerobic rumen Chytridiomycetes inferred from small subunit ribosomal RNA sequence comparisons[J].Canadian Journal of Botany,1991,69(9):1964–1971.
[18] SCHOCH C L,SEIFERT K A,HUHNDORF S,et al.Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2012,109(16):6241–6246.
[19] MONCALVO J M,VILGALYS R,REDHEAD S A,et al.One hundred and seventeen clades of euagarics[J].Molecular Phylogenetics and Evolution,2002,23(3):357–400.
[20] WANG X W,LIU X Z,GROENEWALD J Z.Phylogeny of anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota),with contributions from yak in China[J].Antonie Van Leeuwenhoek,2017,110(1):87–103.
[21] DAGAR S S,KUMAR S,MUDGIL P,et al.D1/D2 domain of large-subunit ribosomal DNA for differentiation of *Orpinomyces* spp[J].Applied and Environmental Microbiology,2011,77(18):6722–6725.
[22] TAN H M,CAO L X.Fungal diversity in sheep (*Ovis aries*) and cattle (*Bos taurus*) feces assessed by comparison of 18S,28S and ITS ribosomal regions[J].Annals of Microbiology,2014,64(3):1423–1427.
[23] BORNEMAN W S,AKIN D E,LJUNGDAHL L G.Fermentation products and plant cell wall-degrading enzymes produced by monocentric and polycentric anaerobic ruminal fungi[J].Applied and Environmental Microbiology,1989,55(5):1066–1073.
[24] LOWE S E,THEODOROU M K,TRINCI A P.Growth and fermentation of an anaerobic rumen fungus on various carbon sources and effect of temperature on development[J].Applied and Environmental Microbiology,1987,53(6):1210–1215.
[25] 李袁飞,孙美洲,成艳芬,等.高效液相色谱法研究瘤胃甲烷菌共存对厌氧真菌代谢产生有机酸特性的影响[J].动物营养学报,2017,29(4):1198–1204.
[26] DEHORITY B A,TIRABASSO P A.Antibiosis between ruminal bacteria and ruminal fungi[J].Applied and Environmental Microbiology,2000,66(7):2921–2927.
[27] JOBLIN K N,MATSUI H,NAYLOR G E,et al.Degradation of fresh ryegrass by methanogenic co-cultures of ruminal fungi grown in the presence or absence of *Fibrobacter succinogenes*[J].Current Microbiology,2002,45(1):46–53.
[28] WEI Y Q,YANG H J,LUAN Y,et al.Isolation,identification and fibrolytic characteristics of rumen fungi grown with indigenous methanogen from yaks (*Bos grunniens*) grazing on the Qinghai‐Tibetan Plateau[J].Journal of Applied Microbiology,2016,120(3):571–587.
[29] WEI Y Q,LONG R J,YANG H,et al.Fiber degradation potential of natural co-cultures of

Neocallimastix frontalis and *Methanobrevibacter ruminantium* isolated from yaks (*Bos grunniens*) grazing on the Qinghai Tibetan Plateau[J].Anaerobe,2016,39:158–164.
[30] 刁其玉,国春艳.提高粗饲料利用率的途径[J].粮食与饲料工业,2005(10):34－36.
[31] CAO Y C,YANG H J.Effect of roughage fibre content on fibrolytic activities and volatile fatty acid profiles of *Neocallimastix* sp.YAK11 isolated from rumen fluids of yak (*Bos grunniens*)[J].Animal Feed Science and Technology,2011,170(3/4):284–290.
[32] PAUL S S,DEB S M,PUNIA B S,et al.Fibrolytic potential of anaerobic fungi (*Piromyces* sp.) isolated from wild cattle and blue bulls in pure culture and effect of their addition on *in vitro* fermentation of wheat straw and methane emission by rumen fluid of buffaloes[J].Journal of the Science of Food and Agriculture,2010,90(7):1218–1226.
[33] NAGPAL R,PUNIYA A K,SEHGAL J P,et al.*In vitro* fibrolytic potential of anaerobic rumen fungi from ruminants and non-ruminant herbivores[J].Mycoscience,2011,52(1):31–38.
[34] THAREJA A,PUNIYA A K,GOEL G,et al.*In vitro* degradation of wheat straw by anaerobic fungi from small ruminants[J].Archives of Animal Nutrition,2006,60(5):412–417.
[35] LEE S M,GUAN L L,EUN J S,et al.The effect of anaerobic fungal inoculation on the fermentation characteristics of rice straw silages[J].Journal of Applied Microbiology,2015,118(3):565–573.
[36] 王砀砀.瘤胃真菌分离鉴定及其在青贮饲料中应用效果评价[D].硕士学位论文.杨凌:西北农林科技大学,2017:42－48.
[37] LEE S S,HA J K,CHENG K J.Influence of an anaerobic fungal culture administration on *in vivo* ruminal fermentation and nutrient digestion[J].Animal Feed Science and Technology,2000,88(3/4):201–217.
[38] SAXENA S,SEHGAL J,PUNIYA A,et al.Effect of administration of rumen fungi on production performance of lactating buffaloes[J].Beneficial Microbes,2010,1(2):183–188.
[39] TRIPATHI V K,SEHGAL J P,PUNIYA A K,et al.Effect of administration of anaerobic fungi isolated from cattle and wild blue bull (*Boselaphus tragocamelus*) on growth rate and fibre utilization in buffalo calves[J].Archives of Animal Nutrition,2007,61(5):416–423.
[40] 王砀砀,赵聪聪,郭奇奇,等.瘤胃真菌分离鉴定及酶学特性[J].农业生物技术学报,2017,25(10):1668－1681.
[41] CHEN Y C,CHIANG Y C,HSU F Y,et al.Structural modeling and further improvement in pH stability and activity of a highly-active xylanase from an uncultured rumen fungus[J].Bioresource Technology,2012,123:125–134.
[42] 曹阳春.牦牛瘤胃厌氧真菌多样性与饲料细胞壁降解酯酶特性研究[D].博士学位论文.北京:中国农业大学,2012:70－75.
[43] RANGANATHAN A,SMITH O P,YOUSSEF N H,et al.Utilizing anaerobic fungi for two-stage sugar extraction and biofuel production from lignocellulosic biomass[J].Frontiers in Microbiology,2017,8:635.
[44] CHUNG D H,CHA M S,GUSS A M,et al.Direct conversion of plant biomass to ethanol by engineered *Caldicellulosiruptor bescii*[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2014,111(24):8931–8936.
[45] JIN M J,GUNAWAN C,BALAN V,et al.Consolidated bioprocessing (CBP) of AFEX™－pretreated corn stover for ethanol production using *Clostridium phytofermentans* at a high solids loading[J].Biotechnology and Bioengineering,2012,109(8):1929–1936.
[46] MINTY J J,SINGER M E,SCHOLZ S A,et al.Design and characterization of synthetic

fungal-bacterial consortia for direct production of isobutanol from cellulosic biomass[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2013,110(36):14592–14597.

[47] AYDIN S,YILDIRIM E,INCE O,et al.Rumen anaerobic fungi create new opportunities for enhanced methane production from microalgae biomass[J].Algal Research,2017,23:150–160.

[48] PROCHÁZKA J,MRÁZEK J,ŠTROSOVÁ L,et al.Enhanced biogas yield from energy crops with rumen anaerobic fungi[J].Engineering in Life Sciences,2012,12(3):343–351.

[49] YILDIRIM E,INCE O,AYDIN S,et al.Improvement of biogas potential of anaerobic digesters using rumen fungi[J].Renewable Energy,2017,109:346–353.

Research Advances On application of Anaerobic Fungi and Its Plant Cell Wall Degrading Enzymes

WANG Dangdang ZHAO Congcong CAI Chuanjiang YAO Junhu CAO Yangchun

(College of animal science and technology, Northwest A & F University, Yangling 712100, *China)*

Abstract: Anaerobic fungi have strong degradation ability of plant tissue, its powerful rhizoid system and a series of plant cell wall degrading enzymes degrade biomass into compounds which are easy to use and have highly additional value. This is of great practical significance for solving the feed shortage, energy crisis and environmental problems. Based on the related research, this paper summarized the taxonomic status, research methods and application research of anaerobic fungi for the purpose of providing references for further research and scientific application.

Key words: anaerobic fungi; plant cell degrading enzyme; biomass resources; application research

*Corresponding author, associate professor, E-mail： caoyangchun@126.com (责任编辑 王智航)